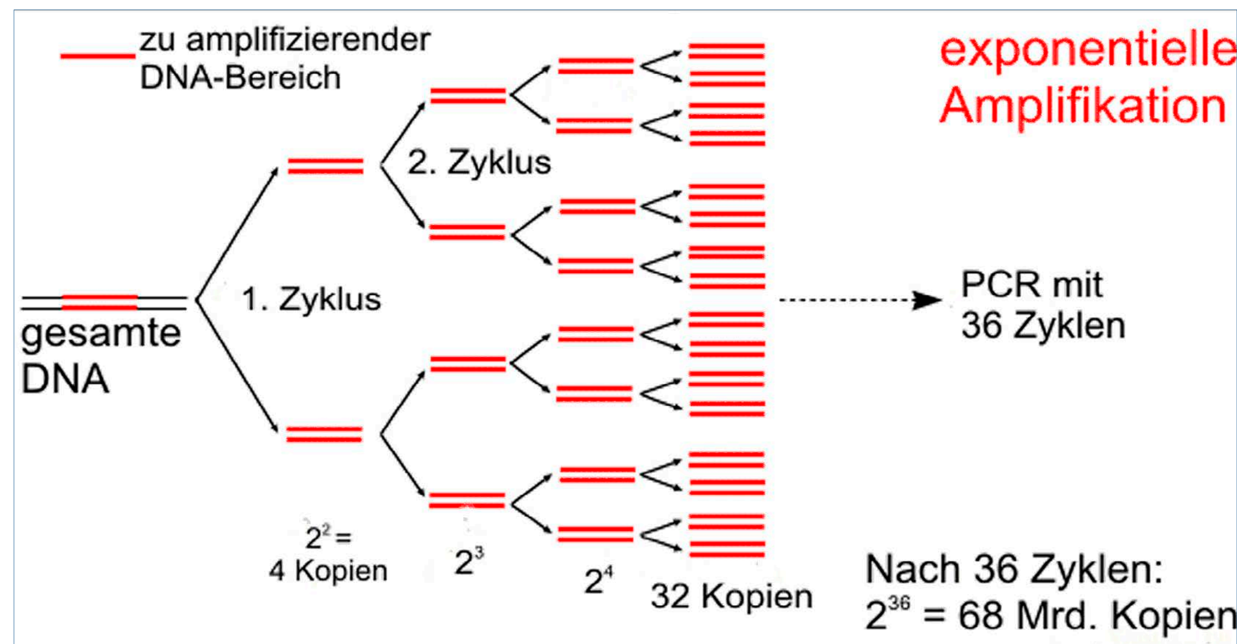
Quelle: https://labor-spiez.ch/pdf/de/dok/pos/88_021_Plakate_PCR_d.pdf

Polymerase-Kettenreaktion

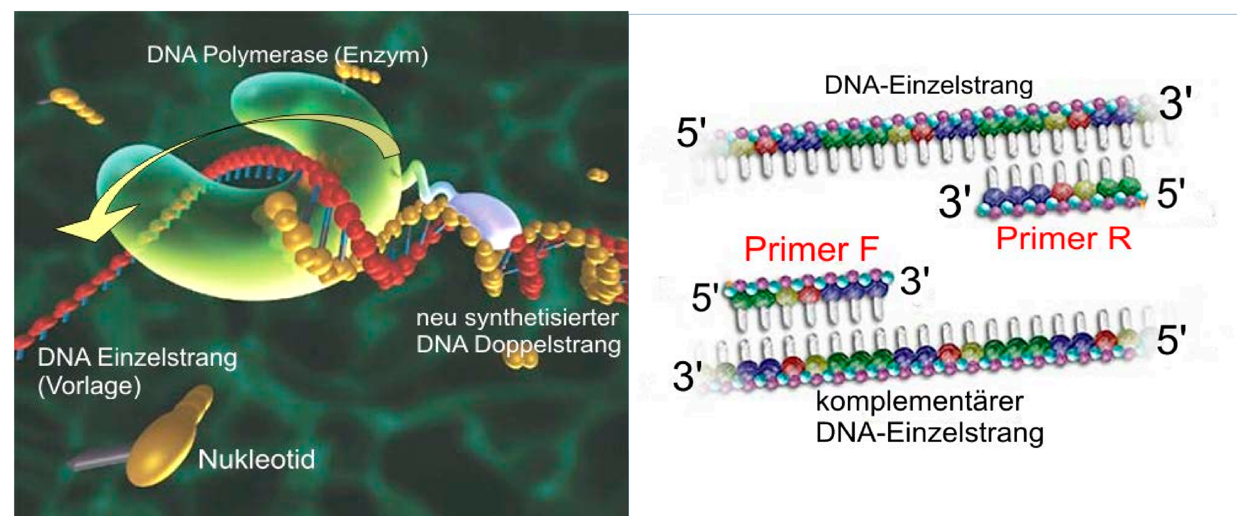


Polymerase-Kettenreaktion (PCR)?

Mit **PCR** (engl. polymerase chain reaction) wird ein vorbestimmter Abschnitt einer Erreger-DNA vervielfältigt. Als «Kopiermaschine» braucht es ein Enzym namens **Polymerase**, welches in einer Kettenreaktion aus sich wiederholenden Temperatur-Zyklen den gewünschten DNA-Abschnitt immer wieder verdoppelt und so eine messbare DNA-Menge generiert.

Vorteile: In 45 min können in einem Volumen von 20-50 µl bis zu zehn Erreger nachgewiesen werden.

Nachteile: Es können nur Erreger nachgewiesen werden, deren Gen-Sequenz bekannt ist. Ob ein Erreger infektiös (virulent, «lebendig») ist oder nicht bleibt unbekannt.



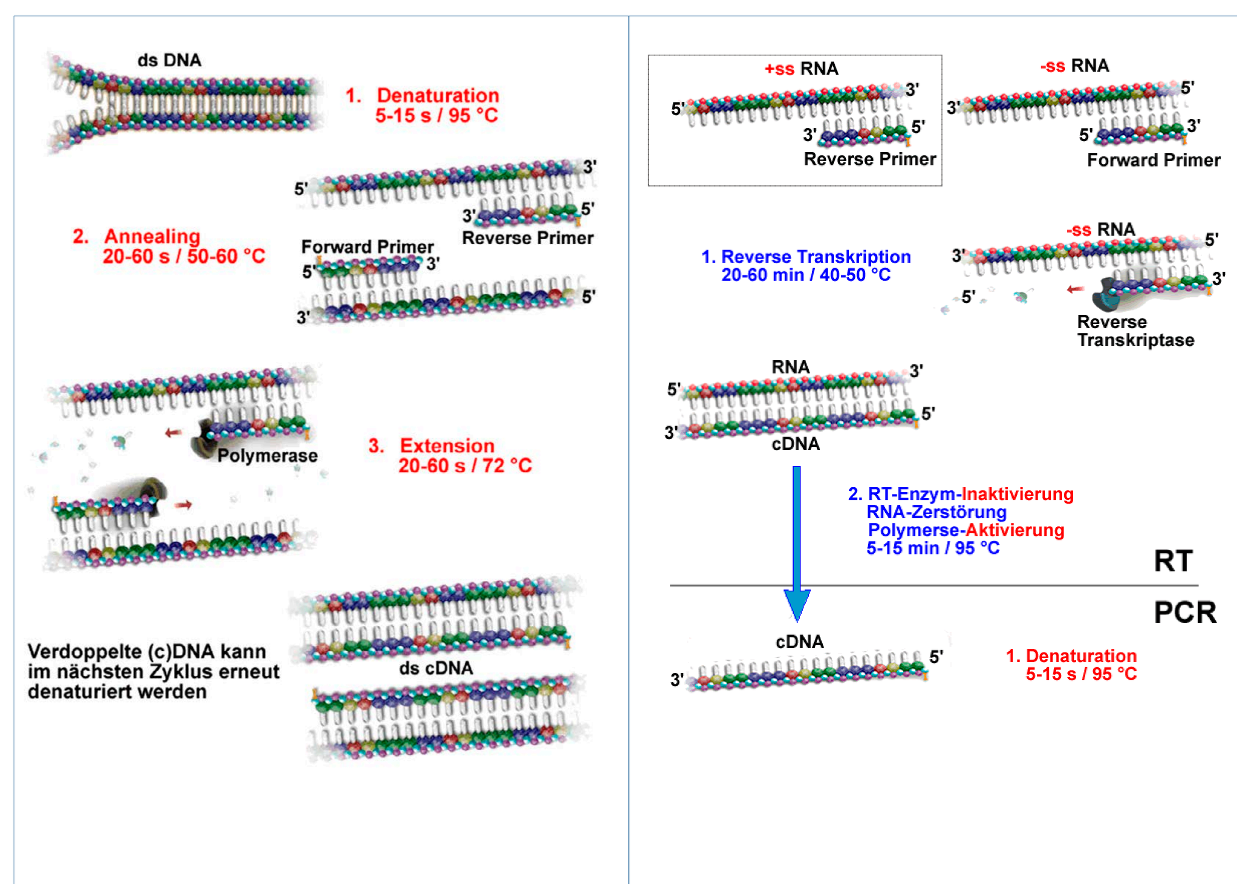
DNA-Polymerase und Oligonukleotide

Für die Vervielfältigung der DNA (**Amplifikation**) wird das Enzym **DNA-Polymerase** benötigt. Als Vorlage dient ein DNA-Einzelstrang des nachzuweisenden Erregers. Die passenden Nukleotide (dNTPs) werden durch die DNA-Polymerase zum Komplementärstrang verbunden.

Die DNA-Polymerase bindet aber nur dort an den DNA-Einzelstrang, wo eine kurze Doppelstrangstruktur als Startpunkt vorliegt. Dieser wird in der PCR mit der Zugabe von **Primer** bestimmt, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt definieren.

Ein Primer ist ein kurzes DNA-Stück bestehend aus 15-30 Nukleotiden, ein so genanntes **Oligonukleotid**. Für beide komplementären DNA-Einzelstränge des Erregers wird je ein Primer (Forward (F) & Reverse (R)) mit Hilfe von Softwares festgelegt

Die dazu benötige DNA-Sequenz des nachzuweisenden Erregers wird im Internet aus öffentlichen Datenbanken kopiert. Die Oligonukleotide werden über Internet bei spezialisierten Firmen bestellt und synthetisiert.

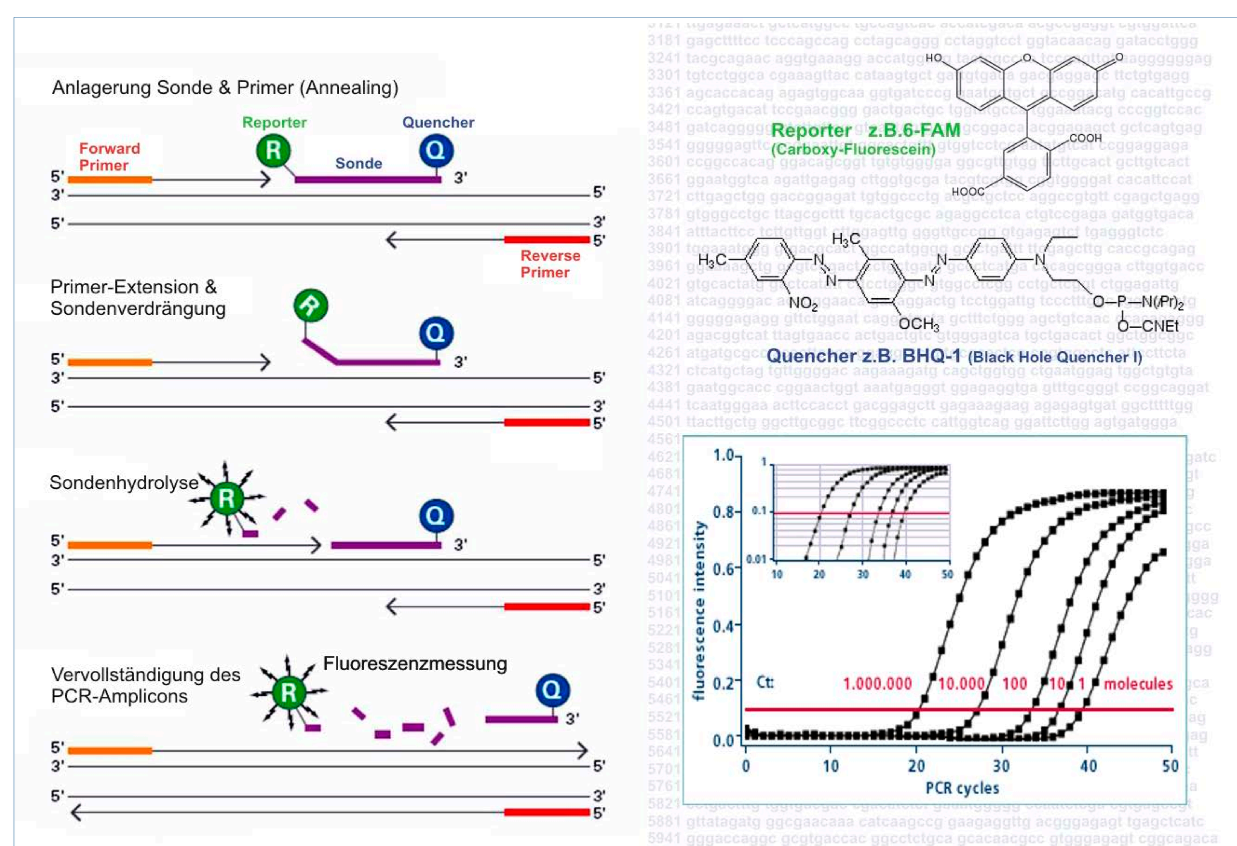


PCR & RT-PCR – Die Kettenreaktion

Die PCR besteht aus einer Serie (Kettenreaktion) von 30 bis 45 Temperatur-Zyklen und wird in einem Thermocycler durchgeführt. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

- **Denaturierung**: Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA auf 95 °C erhitzt um die Stränge zu trennen. Es stehen zwei Vorlagen (Matrizen).
- **Annealing** (Anlagerung): Die Temperatur wird Primer-abhängig gesenkt damit sich die spez. Primer an die DNA-Einzelstränge anlagern können.
- **Extension** (Elongation): Die DNA-Polymerase bindet bei 60°C an die kurzen doppelsträngigen Bereiche und repliziert den komplementären Strang.

Da die Genome vieler Virenarten aus RNA bestehen, muss diese für die PCR zuerst in DNA umgeschrieben werden. Dieser Vorgang wird **Reverse Transkription (RT)** genannt und kann im selben Ansatz der PCR vorgeschalten werden.



Quantitative real-time PCR

Bei der real-time PCR findet zusätzlich eine **Quantifizierung** des amplifizierten DNA-Abschnittes statt. Dazu werden nach jedem PCR-Zyklus **Fluoreszenz**-Messungen durchgeführt, wobei die Zunahme der kopierten DNA mit der Zunahme der Fluoreszenz korreliert.

Als Fluoreszenz-Quelle können DNA-Farbstoffe (z.B. **SYBR Green**) verwendet werden, welche nur mit doppelsträngige DNA interkalieren (binden). Nach Anregung kann deren zunehmende Fluoreszenz gemessen werden. Es kann jedoch nicht zwischen spez./unspez. PCR-Produkten unterschieden werden.

Eine spezifischere Methode beruht auf den Zusatz einer zwischen den Primer liegenden Sonde (z.B. **TaqMan**-). Diese ist an den Enden mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (R), und einem Fluoreszenz-absorbierenden Quencher (Q) markiert.

Durch Verwendung einer speziellen DNA-Polymerase mit **5'-3'-Exonuklease-Aktivität**, wird die Sonde während der Synthese des Gegenstranges vom 5'-Ende her abgebaut, wodurch Quencher und Fluorophor voneinander entfernt werden. Die steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden.